

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平2-138978

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)5月28日

C 12 N 15/48

ZNA

8515-4B

7/04

C 12 P 21/02

C

8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 18 (全 15 頁)

⑭ 発明の名称 新型蛋白質、該遺伝子を含む配列、ベクター、製造方法及び用途

⑮ 特 願 平1-120229

⑯ 出 願 平1(1989)5月12日

優先権主張 ⑰ 1988年5月12日 ⑱ 米国(US) ⑲ 193321

⑳ 発 明 者 ウィリアム・アラン・ アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02140、ケンブリッ
ハセルティン ジ、マウント・バーナン・ストリート・24㉑ 出 願 人 デイナ・フアーバー・ アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02115、ボストン、
キヤンサー・インステ ビニイ・ストリート・44
イテュート㉒ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

新型蛋白質、該遺伝子を含む配列、ベ
クター、製造方法及び用途

2. 特許請求の範囲

(1) (a) ウイルス蛋白質をコードするAUGコド
ンがすぐ上流に適切な読み枠で挿入されているH
IV-1ゲノムの5541~8017領域のヌクレオチド
に對應する十分な数のヌクレオチドを含む
DNA断片であって、全HIVゲノムを含むしな
いもの；及び(b) 該DNA断片の上流にあるプロモータを
含むベクター。(2) VDU遺伝子を含むが、全HIV-1ゲ
ノムを含むわけではないDNA断片。(3) 十分な数のヌクレオチドがHIV-1の
[1]領域のU樹状読み枠に對する特許請求の範

囲第1項に記載のベクター。

(4) (a) 特許請求の範囲第2項記載のDNA断片、
及び(b) 該DNA断片上流のプロモータを含む
ベクター。(5) プロモータがウイルスプロモータであって、
ベクターがまたエンハンサー及びポリ阿德ニル化
配列を含む特許請求の範囲第4項記載のベクター。(6) VDU遺伝子により産生される實質的に純粋
な蛋白質。(7) 特許請求の範囲第2項記載のDNA断片の
VDU遺伝子により産生される蛋白質。(8) 蛋白質の分子量が約18kDである特許請求の
範囲第7項記載の蛋白質。(9) 蛋白質の分子量が約15kDである特許請求の
範囲第7項記載の蛋白質。

(10) 調整して15kD蛋白質を形成する特許請求の

特開平 2-138978(2)

範囲第8項記載の蛋白質。

00 特許請求の範囲第7項記載の蛋白質の抗原決定基と免疫学的に交叉反応する抗原決定基を有するポリペプチド。

01 VPU遺伝子発現の73~81番目アミノ酸と免疫学的に交叉反応する特許請求の範囲第11項記載のポリペプチド。

02 ウイルス蛋白質に対して生じる抗体の存在の検定方法であって、

(a) 所定の標本を採取し、

(b) 特許請求の範囲第11項のポリペプチドを該標本に添加して、

(c) 該ポリペプチドにより複合体が形成されたか否かを測定することより成る方法。

03 ウイルス蛋白質の存在に関する検定方法であって、

(a) 所定の標本を採取し、

3 -

載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新型特異ポリペプチド、このポリペプチドの製造方法、この蛋白質に対する抗体、上記ポリペプチド中に存在する抗原決定基に対する抗体の存在を生物標本で検出するための検定、及びウイルス複製に及ぼすこの蛋白質のマイナス効果に対する検定に関する。

ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1, HTLV-Ⅱ, LAV又はHTLV-Ⅱ/LAVとも書かれる)は後天性免疫不全症候群(AIDS)及び関連疾患の原因である[Barre-Sinoussi等, Science 220: 800~803(1983); Gallo等, Science 224: 500~503(1984); Land等, Levy等, Science 225: 840~842(1984); Popovic等, Science 224: 497~500(1984); Sarngadharan等, Science 224: 506~508

(b) 抗体を特許請求の範囲第7項記載の蛋白質に添加して、

(c) 該抗体により複合体が形成されたか否かを測定することより成る方法。

04 十分量の特許請求の範囲第7項記載の蛋白質を該蛋白質を標的に発現しないHIV-1株感染ウイルス細胞に投与することより成るHIVウイルス複製の抑制化方法。

05 さらに、特許請求の範囲第7項記載の蛋白質の抑制化作用と類似の作用を示す化合物を前記ウイルス細胞に十分量添加することより成る特許請求の範囲第15項記載の方法。

06 さらに、特許請求の範囲第7項記載の蛋白質の抑制化作用を増強する化合物を前記ウイルス細胞に十分量添加することより成る特許請求の範囲第15又は16項記載の方法。

07 増強が相乗的である特許請求の範囲第17項記

4 -

(1984); Siegal等, N. Engl. J. Med. 305: 1439~1444(1981)]。反期無産細胞とその後免疫系及び中枢神経系の進行性脱機能が本疾患の特徴である。本ウイルスの研究から、複製は高度に調節されており、且つTリンパ球のCD4陽性ヘルパーサブセットの潜伏感染と溶融感染とが組織培養中で起ることが示されている[Zagury等, Science 231: 850~853(1988)]。感染患者におけるウイルス発現もまた、感染ウイルスの力価が本疾患経過を通じてずっと低い場合は調節されるものと思われる。HIV-1の複製及びゲノム構成の分子的研究からは、それが少なくとも8個の遺伝子をコードすることが示されている[Ratner等, Nature 313: 277~284(1985); Sanchez-Pescador等, Science 227: 484~492(1985); Muesling等, Nature 313: 450~457(1985); Wain-

5 -

—558—

6 -

特開平 2-138978(3)

Hobson 等, Cell 40: 9~17 (1985)]。3 種類の遺伝子、すなわち gag 遺伝子、pol 遺伝子及び env 遺伝子はすべてのレトロウイルスに共通している。しかしながら、そのゲノムはまた、大半のレトロウイルスに共通して認められるわけではない別の 3 つの遺伝子、すなわち src 遺伝子、tax 遺伝子、trk 遺伝子、3' ORF 遺伝子及び R 遺伝子をもコード化する。

[Soderoski 等, Science 231: 1549~1553 (1986) ; Arya 等, Science 229: 69~73 (1985) ; Soderoski 等, Science 227: 171~173 (1985) ; Soderoski 等, Nature 321: 412~417 (1986) ; Feinberg 等, Cell 45: 807~817 (1986) ; Wong-Staal 等, AIDS, Rea. and Human Retroviruses 3: 33~39 (1987) : これらはすべて参照により本明細書中に含めるものとする。]

- 7 -

表面に吸着し且つ異なる HIV 株で高度に保存される別の蛋白質がある場合にそれは有用であると思われる。

ウイルス複製にマイナス効果（負の作用）を示す HIV 産物はどれも、治療に用いる可能性を評価する必要がある。特に、負の作用を増強又は模倣する作用としての薬剤の有用性を評価するために、この負の作用を検定することが必要である。

発明の要約

HIV-1 感染細胞により発現される蛋白質をわれわれは発見した。その蛋白質は分子量が約 18 kD であるが、しかし 15 kD 位に断片化する。この蛋白質は抗原決定基を有し、AIDS 感染患者から得た患者抗血清はこの蛋白質の両型を認識するが一方、正常患者の抗血清はそれを認識しない。

この蛋白質は培養ヒト CD4+T 細胞における HIV-1 ウイルス複製に負の作用を及ぼすと

- 9 -

その他のレトロウイルス、すなわち HIV-1 II 及び Simian 免疫不全ウイルス (SIV) (従来 STLV-II と呼んでいた) のウイルスゲノム由来のヌクレオチド配列もまた tax 調節配列及び src 調節配列を含み、構造遺伝子の含有に加え、トランスアクチベーションを示す [Guyader 等, Nature 325: 882~889 (1987) ; Chakrabarti 等, Nature 328: 543~547 (1987)]。

HIV-1 と、HIV-1 II のような他のレトロウイルスとを容易に区別できる方法があれば役に立つと思われる。

AIDS ウイルスに対するワクチンの開発に付随する問題の 1 つは、HIV の種々の株が高度に保存されているわけではないことである。また、細胞表面に吸着するためにターゲットとして用いられている外膜蛋白質 ~~（ギャベローブ）~~ ^(gp120) には低親和性で多大の多変異性が認められる。したがって、細胞

- 8 -

考えられる。

発明の説明

HIV-1 が付加的蛋白質をコードし、またこの蛋白質に対する抗体が HIV-1 感染者の血清中に検出されることが判明した。さらに、HIV-1 単離物製と他のヒト及びサル免疫不全ウイルスとを区別するためにこの蛋白質を用いることができる [Guyader, M. 等, Nature 325: 上記 (1987) ; Hirsch, V. 等, Cell 49: 307~319 (1987) ; Chakrabarti, I. 等, Nature 328: 上記]。それは慢性的ウイルスが細胞の蛋白質をコードしないことも判明しているからである。

この蛋白質は、HIV-1 ゲノムのヌクレオチド 5541~8017 に対応する十分な数のヌクレオチドを含む DNA 断片により発現されるが、この場合 AUG コドンがこの領域のすぐ上流に適切な読み

- 10 -

-559-

特開平 2-138978(4)

枠で挿入されておりポリペプチドをコードすることができる。この領域は典型的にはリボ核酸読み枠(open reading frame)に対応するHIV-1の gag 遺伝子及び env 遺伝子の第一コード化エキソンと外膜(エンベロープ)糖蛋白質遺伝子との間の領域からのこのリボ核酸読み枠の模式図を図1Aに示す。しかしながら、多数の株は適当な読み枠中にAUGコドンを含まない。HIV-1のEII株にはこのような配列が含まれている。図1Aは、SIV(20,21)及びHIV-2(ROD単離物, 19)と比較した場合のHIV-1(EII単離物, 24)の中心領域の遺伝子構成を示している。矢印はウイルス遺伝子におけるイニシエータAUGコドンを示している。多数のHIV-1株は、アミノ酸長が約80-82であってAUGコドンにより開始された場合にこの領域から合成されるこの蛋白質をコード化する能力がある。

- 11 -

を含有する(図1C)が、これは膜輸送配列と似ている。

このことは、細胞膜を通して該蛋白質が輸送されることを示唆する。さらに、ウイルスゲノム内のリボ核酸読み枠の位置は、該蛋白質が外膜糖蛋白質に関する交互的リーダー配列を形成することを示唆する。位置Xでのリボ核酸のスプライシングイベント及び翻訳時のフレームシフトの発生により、外膜糖蛋白質との融合蛋白質が生じる。このような場合は、リボ核酸は外膜糖蛋白質のアミノ末端に付着して新しいアミノ末端を形成するようになる。

分子重が約15キログルトン(kD)の蛋白質を産生して、分子量約15kDの短い蛋白質を作ることができる。

この蛋白質に関する遺伝子はIと呼ばれている。開放読み枠中に存在するため(Wain-Hobson,

- 13 -

図1Bは様々な株間のこの蛋白質配列を並列して示したものである。EII株を参照のために挙げる。標準的方法を用いて空所()を挿入し、比較し易くした。印は同一アミノ酸を示す。比較したHIV単離物としては、EII, Moll [Alizon, M., 等, Cell 40: 63-74 (1986)], HXBc2, BH-10, BH8, pIIxB3 [Ratner, L., 等, Nature 313: 277-283(1985)], BRU [Wain-Hobson, S, 等, Cell 40: 9-17(1985)]及びUS1-2 [Sanchez-Pescador, R, 等, Science 227: 484-492(1985)]が挙げられる。

これらの株を一般的に入手できる。US1-2は39番目に終止コドンを含むが、しかしながら、単一フレームシフトは、EII参照配列に比してよく保存されるアミノ酸長43だけ大きい蛋白質を生じる。この新しい蛋白質は疎水性リーダー配列

- 12 -

S, 等, Cell 40: 9-17(1985)]、ウイルス蛋白質U及びウイルス蛋白質Uに関する遺伝子VPUと呼ぶよう提案する。

この蛋白質の特性をさらに詳しく調べるために、アミノ酸配列組成物を精製して蛋白質の疎水性傾向に対する配列に対応させて2つのオリゴペプチドを作った。ペプチド1と呼ばれる第1のオリゴペプチドはアミノ酸28-41に対応しており、一方ペプチド2と呼ばれる第2のオリゴペプチドは、アミノ酸73-81に対応した(図1B, 1C)。標準的方法を用いてこれらのペプチドをkeyhole limpet hemocyaninに結合し、これを用いて、例えば第3番のウサギに抗体を産生した。抗原を何回か注射した後、ウサギは免疫に用いたオリゴペプチドを認識する抗体を産生した。

図2はVPU遺伝子産物のin vitro特性を示す。15kDウイルス蛋白質と15kDウイルス蛋白質は

- 14 -

-560-

特開平 2-138978(5)

ともに、ペプチド2に対するウサギ抗血清によって沈降する(図2A, レーン4参照)。ペプチド1に対する抗血清もこれらの蛋白質を沈降させるが、しかしその程度は弱い。これに対して、これらの蛋白質は免疫前ウサギ血清から得た血清では沈降しなかった(図2A, レーン3)。図2DのデータはHIV血清陽性患者抗血清も15KD蛋白質と10KD蛋白質とを認識することを立證している(レーン2)。2つの蛋白質を沈降する患者抗血清のこの能力は一部はペプチド2で融合される(レーン3参照)。切断外膜面物を免疫沈降するHIV-1感染患者の19名の血清のすべてがまた、15KD蛋白質と10KD蛋白質とを沈降することが判明した。正常患者抗血清はこれらの蛋白質を認識しなかった(レーン1)。

これらの蛋白質はHIV-1プロウイルス株の膜で高度に保存されると考えられる。事実、単離

- 15 -

[Terwilliger, E. 等, J. Virol., 60: 754-760(1986)]。VPUを発現できないプロウイルスは、例えばプロウイルスHXBc2によるトランスフェクションで産生され、培養内のT細胞中で成育するウイルスの能力によって実証される通り、複製可能であるが、しかしこれはVPU欠失ウイルスである。しかしながら、これは、VPU産物がウイルス複製又は宿因の調節に必要な役割を演じる可能性を除外するものではない。

実際、p15^{VPU}及びp10^{VPU}に類似の蛋白質に関するコンピュータの助けを借りた研究により、HIV-2及びSIVが同様の蛋白質をコード化しないことが判明した。U₁様み様に匹敵する開放読み枠を含む株はなかった。HIV-2株とSIV株はともに、HIV-1単離物の集合に欠けている開放読み枠、すなわちX開放読み枠を含む

- 17 -

した全HIV-1プロウイルス株にVPUに対応する領域に開放読み枠が含まれる。しかしながら、in vitroで調査した多数の個々のプロウイルス株は、VPU発現を防止する取一点突然変位のためにこの領域から蛋白質を産生できないと考えられる。実際、同一ウイルス単離物から単離された異なるプロウイルス株はVPUをコード化する能力に関してはヘテロである。例えば、111B単離物の個々のプロウイルス株HXBc2, BH10, BH-8及びBH-3はこれに関しては異なっている(図1B参照)。個々の独立したプロウイルスクローンが他のウイルス蛋白質、特に3' ORF産物をコード化する能力における同様の変異も注目されている。例えば、3' ORFに関する111Bの単離物の集合、蛋白質産物を切断する突然変異により野生型より迅速に培養内で複製するウイルスが生じる。

- 18 -

右する[Guyader, M. 等, Nature 326, 上記(1987)]が、しかしVPU蛋白質とX開放読み枠から形成される可能性があるすべての蛋白質との間には検出可能な類似性は認められない。さらに、検査したHIV-2感染患者の血清はどれもVPUに対する抗体を含有しておらず、又、SIV感染サルRhesus macaquesにおいてもVPU産物に対する抗体は検出されなかった。

したがって、p15^{VPU}及びp10^{VPU}に対する抗血清を用いてHIV-1とSIV又はHIV-2との感染を区別できる。

さらに、VPU産物に対する患者抗体の検定を用いて感染を減免するHIV-1の段階を測定することもできる。調節蛋白質をコードするのを用いるウイルス伝令RNAの研究により

[Mensing, M. A. 等, Nature 313: 450-458(1985), Arya, S. K. 等, Science 229:

- 18 -

-561-

特開平 2-138978(6)

69~73(1985)、及び Sndroski, J. 等.

Nature 321: 413~417(1986)」、VPUがスプライシングによってこのようなウイルス

mRNAから除外されることは明らかである。したがって、VPUは、完全にスプライシングされた mRNAのみが gag 上流因子存在下で発現するので、この産物不在下では作られないと考えられる[Sndroski, Nature 321, 上記; Folinberg, M. B. 等, Cell 46, 上記(1986)]。その結果、VPU蛋白質は、他のビリオン蛋白質のように、感染細胞に合成されるので、患者抗体を測定することによって疾患の段階を測定することが可能である。

U蛋白質の発現は、本明開書に開示した標準的方法を用いて、当業界の当業者により迅速に実施可能である。例えば、ヌクレオチド5541~8017由来の十分な数のヌクレオチドに対応するヌクレオ

- 19 -

チド配列を使用すべきである場合は、ヌクレオチド配列5541の前に対応するヌクレオチドに、U開放読み枠のすぐ上流でこれに対して適当な読み枠内にAUGコドンを導入するか、又はこのような配列を生成するための点突然変異を作るかしなければならない。しかしながら、当業界で十分公知の標準的方法によりこれを行うことができる。

当業界で十分公知の方法を用いて、標準発現ベクター、例えばSP6プラスミドにVPU遺伝子を導入することにより(プラスミドpE1の作製を示す図4を参照されたい)、このプラスミドを用いて、標準技法によりp15VPU及びp16VPUを合成することができる。

この蛋白質を使用して抗原を調製し、ワクチン、例えば生弱毒化ワクチンを作ることができる。この蛋白質を用いて、蛋白質に対する抗原反応を起こすことができるし、また蛋白質がウイルス感染

- 21 -

チド配列であるVPU遺伝子を含むDNA断片を作成できるが、この場合この領域のすぐ上流にこの領域に対して適当な読み枠にAUGコドンを導入し、U蛋白質を発現する。典型的にはこのDNA断片をその断片の上流にプロモータ好ましくはウイルスプロモータを含むベクターに挿入する。ベクターは好ましくはエンハンサ及びポリアダニル化シグナルをも含む。HIVプロウイルスにおけるU開放読み枠に対応するヌクレオチド配列を用いることが好ましいが、しかしながら、HXBc2のようなAUG開始コドンを含まない株を用いる場合は、HIV株E11で生じているように、イニシエータ配列AUGを適当な読み枠に付加することが保証されるよう注意しなければならない。よって、U開放読み枠に対応する配列の使用が最も好ましい。

例えばHXBc2株から得たU開放読み枠に対

- 20 -

応する表面に見出されるという前記特性により、且つこの蛋白質が種々のHIV-1株に高度に関係があると思われるために、製造されたワクチンは特に有用であると考えられる。

上記の通り、それは高度に保存される抗原決定基を含むし、且つHIV-1感染細胞に特異的であると思われるため、この蛋白質は、生物検体を検定してそれらがHIV-1感染細胞を含むかどうかを測定する診断手段として特に有用である。標準技法を用いてこれらの検定を準備できる。例えば、所定の標本、すなわち検査すべき生物標本を採取し、抗イディオタイプ抗体又は免疫学的にp15VPU及びp16VPUの抗原部位に類似のものを付加し得る。例えば、本明開書に記載の、アミノ酸78~81に対応するペプチド2(図1B, 1C)は、このような抗原部位を反映している。好ましくはモノクローナル抗イディオタイプ抗体を使用する。

- 22 -

-562-

特開平 2-138978(7)

次いでこの標本をスクリーニングして反応が認められるか、すなわち複合体が抗体と抗原の間に形成されるか否かを測定する。そうする代わりに、公知の免疫検定方法、例えば融合免疫検定又は免疫沈降（サンドイッチ）検定を用いて、ウイルス蛋白質とそれ自体の抗原決定基に対するモノクローナル又は多価抗体により検定可能である。

この蛋白質は培養中のHIV感染の伝染速度に弱毒化作用を及ぼすと考えられるため、それは、この感染を根絶又は増強するよう企図された薬剤又はその他の化合物のスクリーニング計画に関する候補を形成するものであるとも考えられる。例えば、その蛋白質を発現しないHIV-1株感染培養物に蛋白質を添加し、複製の弱毒化程度を測定し、次いで標準的技法によりこの弱毒化作用を増強する薬剤をスクリーニングすることができる。VPU遺伝子含有発現ベクターで細胞をトランス

- 23 -

Nucl. Acid. Res. 12: 7035~7056 (1984))を用いて *in vitro* で合成したRNAを使用し、*in vitro* 赤血球膜溶解産物をプログラミングすることにより調べた [Pelham, H. P. B. 等, Emu, J. Blocher, 57: 247~256 (1986)]。 gag 遺伝子、 pol 遺伝子及び一部の env 遺伝子の最初のコード化エキソン間の領域に^{たが}ま^たなるHIVプロウィルスのヌクレオチド長2231の制限断片からRNAを作製した。実験用テンプレートはSP6バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーター [Mellon, D. A 等, 上記] に対して 3' 側にあるHIV-1のE11株のプロウィルスの断片 [Allison, M. 等, Cell 46, 上記] より得た。図4は、RNA合成に用いるSP6プラスミドを示す。 gag 遺伝子、 pol 遺伝子及び一部の env 遺伝子の第一コード化エキソン間の領域に^{たが}ま^たなるHIV

- 25 -

フェクトすることを含む当業界で十分公知のいずれかの技法により蛋白質を添加可能である。したがって、それら独自ではウィルス複製に対して臨床的に有効でない薬剤は、U蛋白質と併用すると弱毒化作用を増強するのに有効となる可能性がめ

る。以下の実施例により本発明をさらに詳しく説明する。これらの実施例は本発明を理解する際の助けとなるべく提示するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例

VPU遺伝子、すなわちAUG開始コドンを含むHIVゲノムの5541から8017までの十分数のヌクレオチドに対応する gag 遺伝子ヌクレオチド配列と env 遺伝子ヌクレオチド配列の最初のコード化エキソン間の領域の蛋白質コード化能力を、Mellon 等の方法 (Mellon, D. A. 等,

- 24 -

E11プロウィルスから得たヌクレオチド長2231のBamHI~B^{gl}I断片は、SP6バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーターの 3' 側をクローン化したものであった。プラスミドを複製化するのに用いる内部制限部位が示されている。この株は、AUGコドンにより開始するこの領域に開放読み枠を有する (図1B) [Allison, M. 等, Cell 46, 上記]。図4に示す通り、このRNA転写に感して認められるウィルス配列は、 gag (BamHI部位) の第一コード化エキソンの 5' 末端から env 内の1839ヌクレオチド (B^{gl}I II部位) にまで及んでいる。 gag 遺伝子に関する開始コドンは、使用制限酵素すなわちBamHIがE11プロウィルス株を gag 開始コドンのTとGの間で切断するので、このRNAにおいては無関係ではない。

このプロウィルス断片由来のRNAを用いて

- 26 -

-563-

特開平 2-138978(8)

In vitro 溶解産物中で産生された蛋白質を ^{35}S -メチオニンでラベルし、硫酸ドデシルトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を用いて大きさにより分離した。図 2A 参照のこと。HIV-1 挿入物に対してポリリンカー 3' に位置する EcoRI 部位で消化して pEUPラスミドを塩酸化し、報告の通り [Pelletier, J. & Sonenberg, N., Cell 40: 515-526 (1985)], SP6 RNA ポリメラーゼによる In vitro 転写用のテンプレートとして用いたが、粗し、GTP 及び CTP 類似体 $m^7\text{GpppG}$ の濃度はそれぞれ 0.2 および 1.0 mM に上昇させた。報告の通り (27)、伝令 RNA を [5'- ^3H] CTP でラベルし、縮製した。寄与する RNA (肝臓の放射能) の In vitro 翻訳を赤血球溶解産物中で実施した [Pelham, H. P. B. 等, J. Biol. Chem., 267: 247-258

- 27 -

する 3 つの抗血清はすべて、ペプチド 1 に対する抗血清と同様に両蛋白質を認識する (レーン 4) が、その親和性はさらに弱い (データは示していない)。図 2A のデータもまた、ペプチド 2 が抗血清による 15 kD 蛋白質と 16 kD 蛋白質の認識に適合することを示す (レーン 5)。しかしながら、ペプチド 1 (レーン 6) 又は無関係ペプチドは抗ペプチド 2 血清とは適合しない (レーン 7)。

In vitro 翻訳産物を分析するために他のブローイリス断片由来の RNA を調製した。1 例の実験において、RNA 合成に使用するテンプレートを制限酵素切断により、予定の AUG コドン (RsaI 部位) に対して 5' 側の 7 ヌクレオチドか又は予定の AUG のコドン (BbvI 部位) に対して 3' 側の 30 ヌクレオチドを切断した (図 4 参照)。抗ペプチド 2 抗血清により認識される特定の蛋白質産物はこれらの実験では観察され

- 29 -

(1986)]。インキュベーションは、 ^{35}S -メチオニン存在下で、30℃で 30 分間行なった。15% SDS-PAGE (レーン 2) により直接、あるいは免疫前ウサギ血清 (レーン 3)、抗ペプチド 2 血清 (レーン 4)、500 mM のペプチド 2 存在下での抗ペプチド 2 血清 (レーン 5)、ペプチド 1 (レーン 6)、又は無関係なペプチド QEIEATATKTSSC (レーン 7) で予め免疫沈降させて、標識化産物を分析した。レーン 1 は、mRNA を加えない全翻訳反応を示す。この系で合成される蛋白質はレーン 2 に示されるウサギ抗ペプチド 2 血清により沈降される蛋白質も示めされている。分子重約 15 kD 及び 16 kD の 2 つの蛋白質は非分離抽出物中で明らかであって、ウサギ抗血清により沈降される。15 kD 蛋白質と 16 kD 蛋白質は、免疫前ウサギ血清からの血清によつては沈降しない (レーン 3)。ペプチド 2 に対

- 28 -

なかった (図 2b, レーン 1 及び 2)。RNA 合成用に使用するテンプレートを予定の停止コドン (NdeI 部位) に対して 3' 側の 102 ヌクレオチドで切断し、抗ペプチド 2 血清を用いて 15 kD 蛋白質と 16 kD 蛋白質を検出した (図 2b) (レーン 3 及び 4)。以下の制限酵素、RsaI (レーン 1)、BbvI (レーン 2) 及び NdeI (レーン 3 及び 4) を用いて pEUPラスミドを塩酸化した。RNA ^{5'} 生成する SP6 を In vitro で翻訳し、抗ペプチド 2 血清を用いて標識化産物に関して免疫沈降を実施した (レーン 1, 2 及び 4)。レーン 3 は全 In vitro 翻訳反応を示す。

111B 単殖種の HXBc2 クローンの配列は、前記の通り、この領域由来の RNA が開放読みの 5' 末端に開始コドンを欠落しているため蛋白質を産生できないであろうことを示唆している。t0.1 類似子、a1.1 類似子及び一部の o1.1 類

- 30 -

-564-

特開平 2-138978(9)

塩子の第一コード化エヒソン間の領域

(BamHI部位:ヌクレオチド8017)にまたがり、E₁に存在するE₁I断片に対応するHXBc2プロウイルスクローンの断片をin vitro転写してRNAを調製した。このRNAを用いて、上記と同様の方法で赤血球溶解産物を企画した。E₁IプロウイルスRNAの融合と同様、toの開始コドンでRNAから欠失した。

15kD産物及び16kD産物に対応する蛋白質は前³⁵S-メチオニン標識化抽出物又は抗ペプチド2血清を用いて得られた沈降物中には認められなかった(図2C、レーン1,2)。SP6RNAポリメラーゼプロモータ[Melton, D. A. 等, Nucleic Acid Res. 12:7035-7056(1984)]の3'側にあるHXBc2D₁とE₁プロウイルスDNAクローン[Dayton, A. I., Cell 44:941-947]から得られたS₁I(5441位

- 31 -

感染ヒト血清(レーン4):又はS₁V・感染サルRhesus Macaque血清(レーン5)を用いて免疫沈降した。その免疫沈降物を15%SDS-PAGE上で分析した。15kD蛋白質及び16kD蛋白質を認識する抗ペプチド2血清の能力を、本ウイルスの3'側半分によりコード化されるHIV-1蛋白質を本質的に発現する3つの細胞株で試験した。[米国特許第800,263号及び第865,151号明細書に記載の通りにこれらの細胞株を調製した。これは参照により本明細書中に含めるものとする]。a₁遺伝子と、しっかり融合されたHIVのプロウイルスE₁I、HXBc2及びM₁I株[Alizon, M. 等, Cell 46, 上記]の

3'LTRとの間の領域を有するクローン化HcL₂細胞株を調製し、次いで標準技法を用いて単離した。これらの細胞株を単離するために用いた親細胞は、toコード化配列を運搬

- 33 -

度)~BamHI(0017位置)切断断片を含むプラスミド(pXU)を標準技法により調製した。EcoRIをpXUを制限化し、in vitro転写用テンプレートとして用いた。

in vitro翻訳後、標準化産物を15%SDS-PAGE(レーン1)上で直接的に、あるいは抗ペプチド2血清(レーン2)、又はHIV-1感染患者血清(レーン3)で予め免疫沈降させて分析した。しかしながら、HIV-1感染患者血清による免疫沈降からは、切断外膜産物の存在は明瞭には示されなかった(レーン3)。

図2Dは、この蛋白質とHIV-2及びS₁Vウイルスとの交叉反応性を示す。pE₁RNA生成SP6のin vitro翻訳後、標準化産物を正常ヒト血清(レーン1):HIV-1感染ヒト血清(レーン2):500nMのペプチド2存在下でのHIV-1感染患者血清(レーン3):HIV-2

- 32 -

するレトロウイルスベクターで感染後に、to遺伝子産物の構造的発現のために予め選択された[Rosson, C. A. 等, J. Virol. 57:379-384(1985)。参照により本明細書中に含めるものとする]。論文中に報告の通り[Lac, T. H. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7579-7583(1984)]、細胞を[³⁵S]メチオニン及びシステインで標識し、細胞溶解物を免疫沈降した。これらの細胞株は本質的にa₁遺伝子産物とa₂遺伝子産物とを産生する。これらの細胞株の作製に用いたプラスミドは、a₁遺伝子の開始コドンの5'側に並列するHIVLTRを含有した。to遺伝子産物はtransに供給された。図3Aは、抗ペプチド2血清(レーン1)又はHIV-1感染患者血清(レーン2)で免疫沈降したHcL₂細胞株溶解産物を示す。図3Bは免疫沈降ウサギ血清(レーン1):抗ペプチド2

- 34 -

-565-

特開平 2-138978(10)

血清 (レーン3): 500 μ M のペプチド2 存在下での抗ペプチド2 血清 (レーン4): 正常ヒト血清 (レーン5): HIV-1 感染患者血清 (レーン6) により免疫沈降された HcLa 1a1 F11 溶解産物を示す。レーン2 は、抗ペプチド2 血清による、pE U RNA から得られた複製化 in vitro 翻訳産物の免疫沈降を要せず。図3Cは、免疫前ウサギ血清 (レーン1): 抗ペプチド2 血清 (レーン2): 正常ヒト血清 (レーン3) 及び HIV-1 感染患者血清 (レーン4) により免疫沈降された HcLa 1a1 Ma1 溶解産物を示す。図3Dは、免疫前ウサギ血清 (レーン1): 抗ペプチド2 血清 (レーン2): 正常ヒト血清 (レーン3) 及び HIV-1 感染患者血清 (レーン4) により免疫沈降した HcLa 1a1 I11B 溶解産物を示す。図3のデータは、抗ペプチド2 抗血清が、in vitro で作られた 15kD 蛋白質と一緒に移

- 35 -

(+1 が転写開始部位) がそれに対応するクローン B H10 からの配列に置換される組み換えプロウイルスを作製した。

HXBc2 とは異なり、B H10 は U 蛋白質に関する AUG 開始コドンを持つ。他の点では B H10 は HXBc2 と非常によく似ている。この組換え in vitro 翻訳産物の結果、1a1、2a1 及び 2a2 翻訳産物における少量の保存アミノ酸置換以外は HXBc2 に非常によく似たプロウイルスクローンを生成することであり、U 開始読み枠を利用する能力を生成することであった。

HXBc2 及び組換え B H10 クローンによる Jurkat 細胞のトランスフェクションの結果、ウイルス産生が起きたが、しかし細胞を通過してのウイルス由来 B H10 の変種は HXBc2 由来ウイルスよりも有意に低かった。

各培養の部分標本は、³⁵S-システイン及び

- 37 -

効する E11 プロウイルス由来の細胞株における 15kD (レーン3) を特異的に認識することを立証する。同じ抗血清が、MAL (図3C) プロウイルス又は HXBc2 (図3D) プロウイルス由来の蛋白質を発現する細胞株の蛋白質を認識しない。これは予期通りの結果であり、HXBc2 プロウイルス又は Ma1 プロウイルスは真実に位置する開始コドンを含みしない (図2B) ためである。E11 プロウイルス由来の細胞株における HIV-1 患者抗血清により 15kD 蛋白質が検出されないのは、明らかに、使用した患者抗血清における抗-YDU 決定が低かったことと、細胞株中の 15kD 蛋白質量が in vitro 翻訳産物に比して非常に少量であったためである。

ウイルス生活環における U 蛋白質の機能を調べるために、5332位置での S a I 部位と 8017位置での BamH1 部位との間の HXBc2 の配列

- 36 -

³⁵S-メチオニンでトランスフェクト後、2、4 及び 7 日目に代数的に標識された。次いで細胞抽出物を AIDS 患者抗血清で免疫沈降し、12.5% ポリアクリルアミドゲルにかけた。そのゲルのオートラジオグラムを図5Bに示す。ここでレーン1、4及び7はそれぞれトランスフェクション後2、4及び7日目の対照細胞である。レーン2、5及び6はそれぞれ2、4及び7日目の HXBc2 でトランスフェクトされた細胞である。レーン3、6、8はそれぞれ2、4、7日目の B H10 の組換えプロウイルス・トランスフェクト細胞である。

上記明細書を利用するものであれば、本発明の精神に沿うものである限りいかなる変更を加えてもよく、本明細書に記載の特定の実施例に何反してもよい。本発明は前記の特許請求の範囲の記載及び図式によってのみ限定される。

- 38 -

-566-

特開平 2-138978(11)

4. 図面の簡単な説明

図1Aは、HIV-2のSIV株及びROD株と比較した場合のHIV-1のEII株の中心領域の遺伝子構成を示す。図1BはVPU遺伝子蛋白質配列を直線で示したものである。図1Cは予測されるVPU遺伝子産物の疎水性を示している。

図2A～Dは、VPU遺伝子産物のin vitro作用を示すラジオグラムである。

図3A～Dは、HIV-1のEII株の3'側半分によりコード化される蛋白質を本質的に証明する細胞系におけるVPU遺伝子産物の固定を示すラジオグラムである。

図4は伝令RNAの合成に使用されるプラスミドpEUの模式図である。

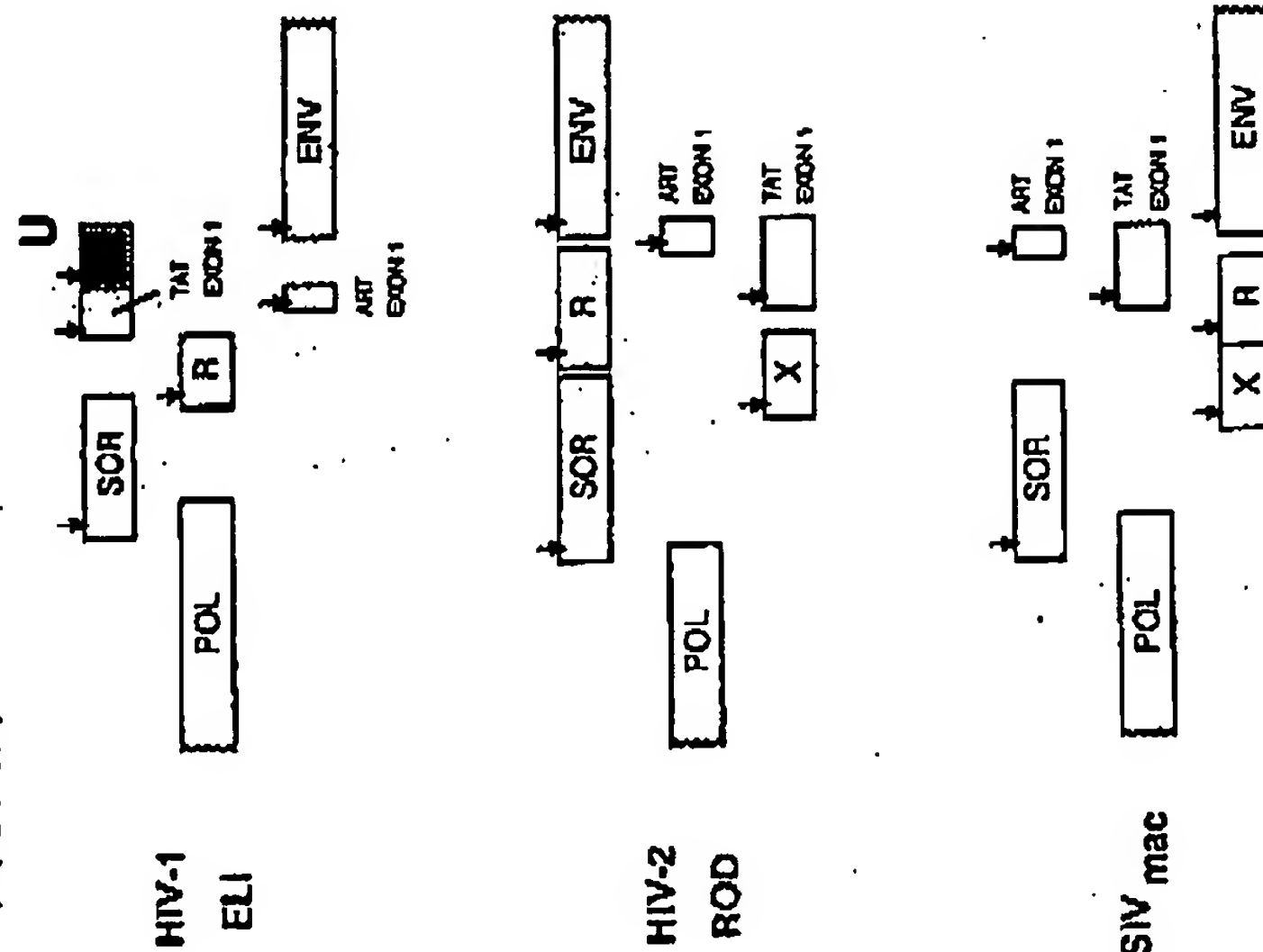
図5Aは、VPU遺伝子産物を産生することができるウイルスとそれを作ることができないウイルスとの比較のために作製される組換えプロウイルスの模式図である。

図5Bは、VPU遺伝子産物を産生可能なプロウイルスプラスミドか又はそれを産生できないプロウイルスプラスミドによるリンパ球のトランスフェクション後に生じるウイルス産物の産生における差を示すオートラジオグラムである。

代理人 弁護士 川口 雄
代理人 弁護士 中村 雄
代理人 弁護士 船山 武

図面の添付 (内容に変更なし)

FIG. 1A



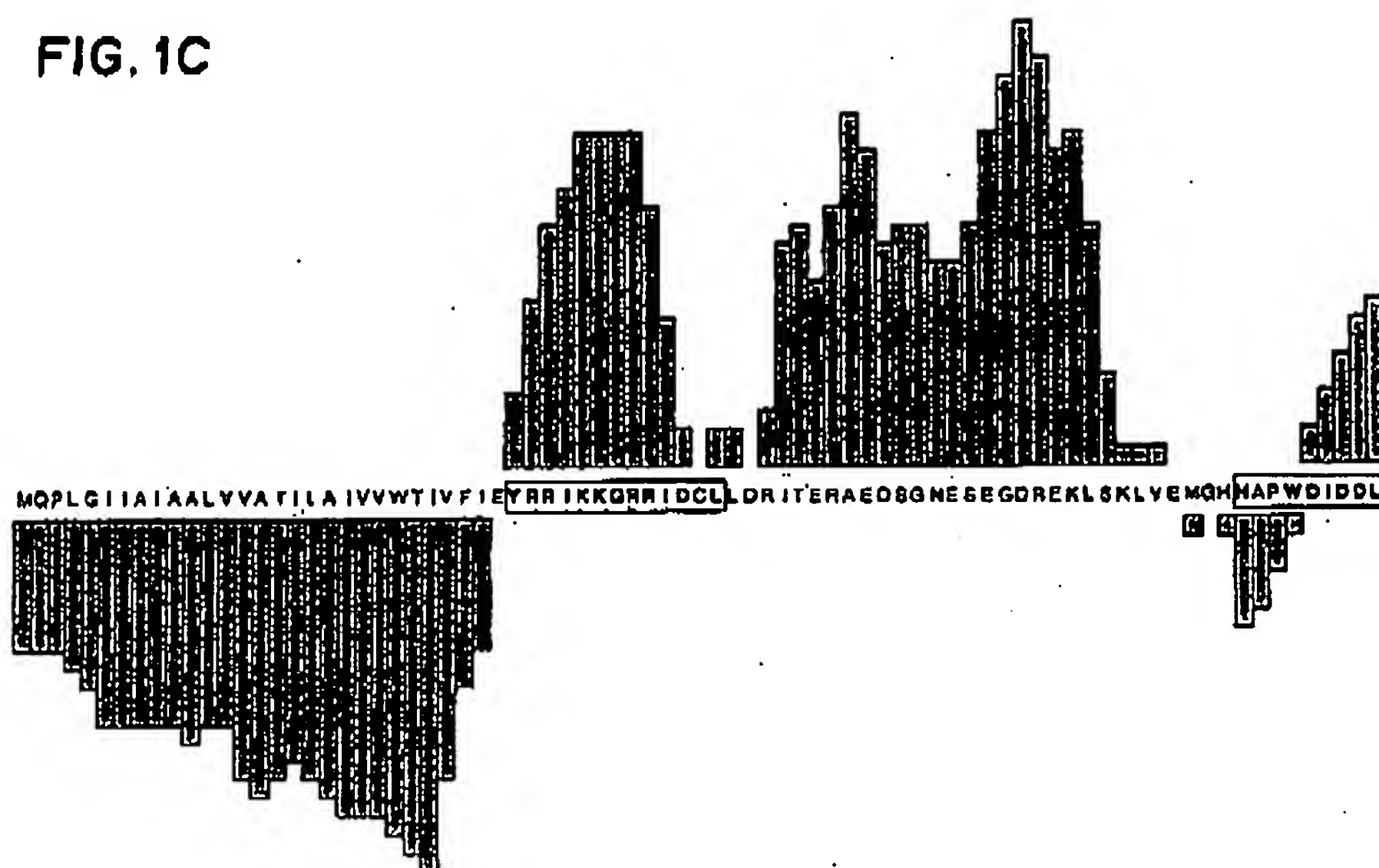
特開平 2-138978(12)

FIG. 1B

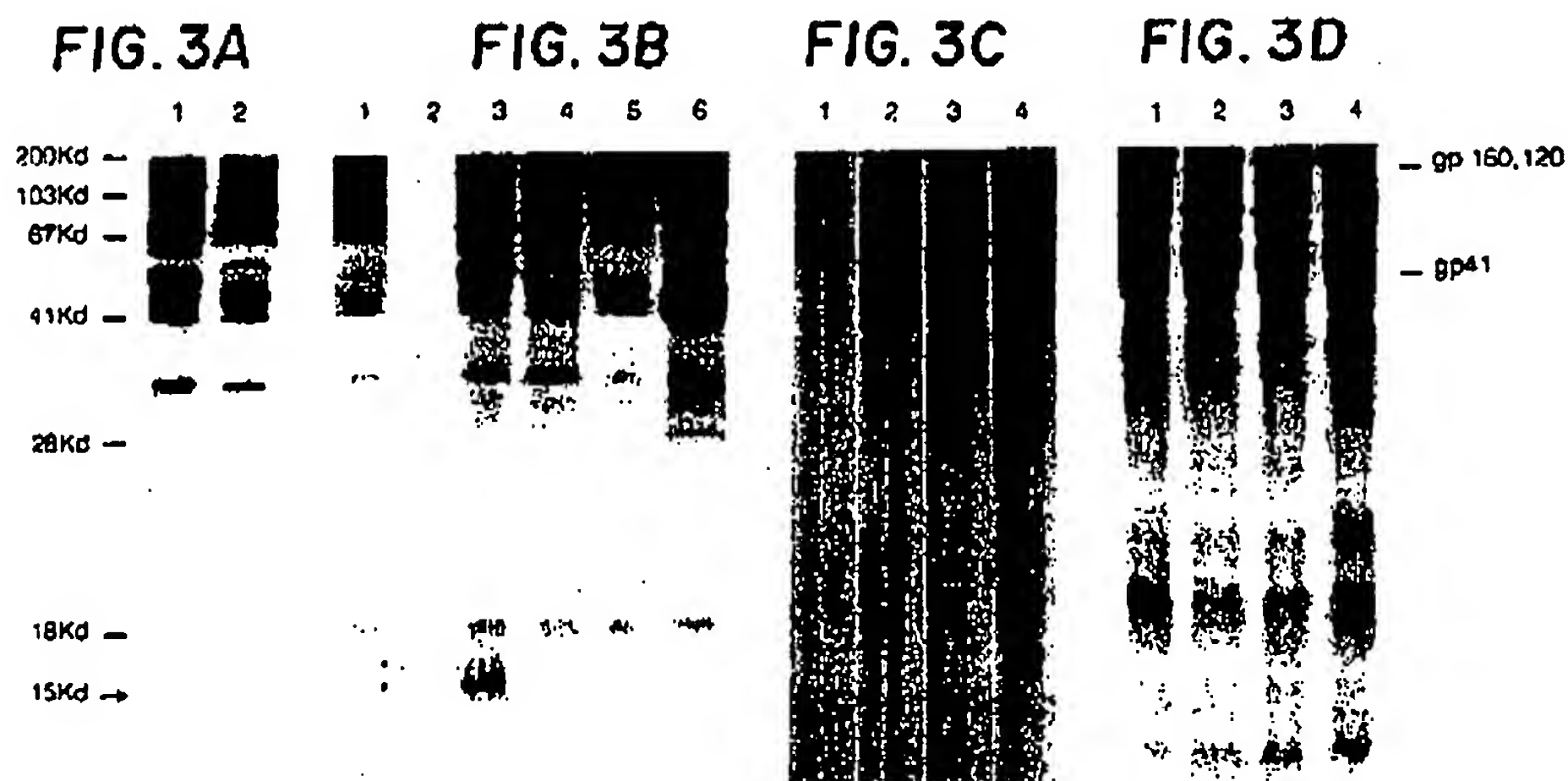
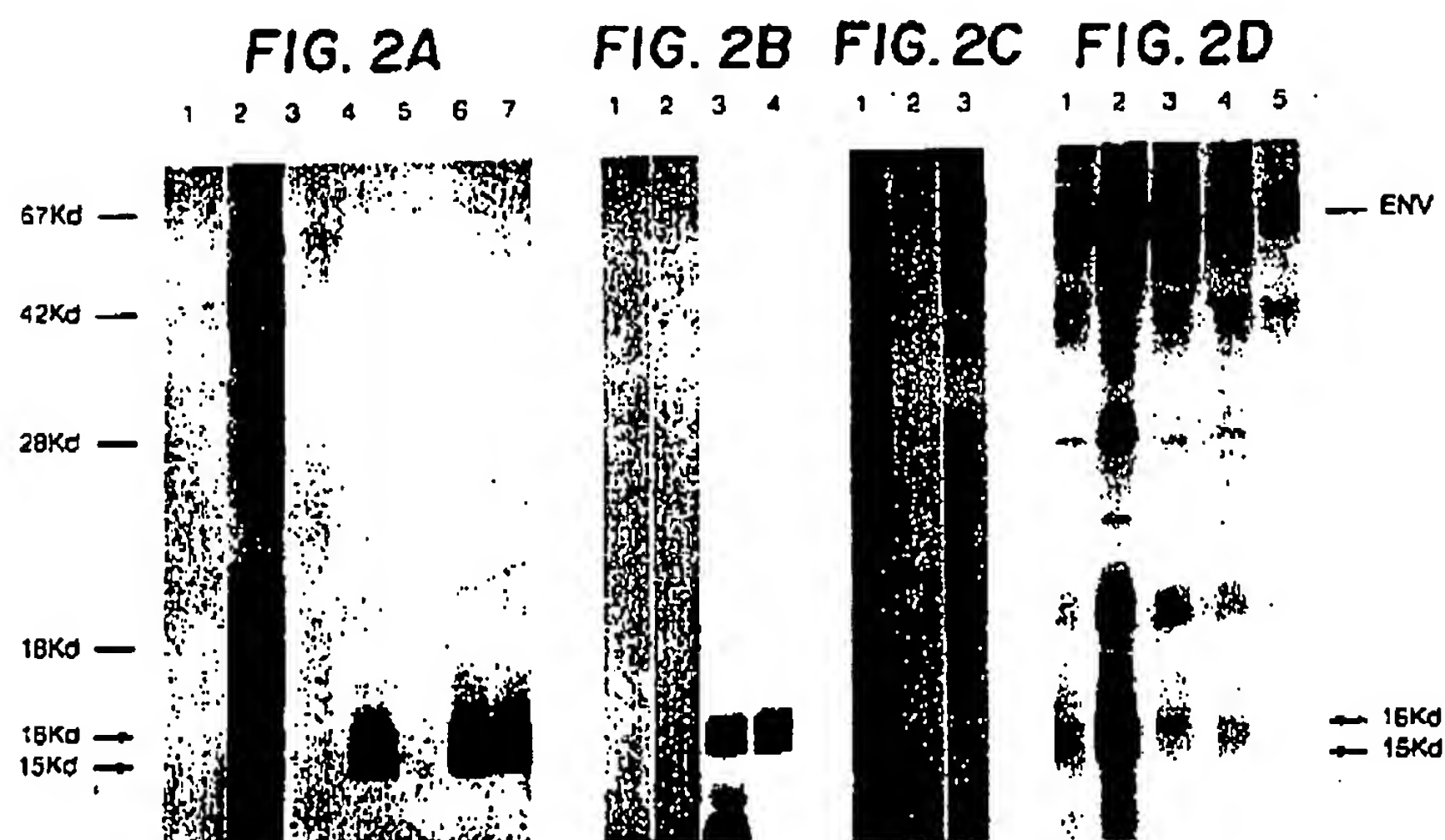
	PEPTIDE #1									
	1	10	11	20	21	30	31	40	41	50
U ELI	MQPLGIIAIA	ALVVAILAI	VVWTIVFIEY	RIKKQRRID	CLLDRIERA					
UHXB2	T**IP*V**V	*****I**	***S**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
UBH10	M**IQ*-**V	*****I**	***K**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
UBH8	M**IP*VT*V	**A*****I**	***K**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
UHXB3	M**IQ*-**V	*****I**	***K**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
UMAL	I**V*L**V	****TL*I**	*****I	*K*RR**K**	R*I**IR***					
UBRU	M**IQ*-***	*****I**	***K**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
USF2	M*S*Q*L**V	S***VA*I**	*****L***	*K*LR**K**	R*I***R*K*					

	PEPTIDE #2									
	51	60	61	70	71	80	81	85		
U ELI	EDSGNESEGD	REKLSKL---	-VEMGHHPW	DIDDL					(81)	
UHXB2	*****E	---I*A*VEM	G*****	*V***					(82)	
UBH10	*****E	---I*A*VEM	G*****	*V***					(81)	
UBH8	*****E	---I*A*VEM	G*****	*V***					(82)	
UHXB3	*****E	---I*A*VEM	G*****	*V***					(81)	
UMAL	*****	TEE****---	*****D***	*V***					(81)	
UBRU	*****E	---I*A*VEM	G***-*****	*I***					(80)	
USF2	*****	QEEK*A*VEM	G---**L***	*V***					(82)	

FIG. 1C



特開平 2-138978(13)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.